

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

AKTIVITÄT VON K-LYMPHOCYTEN (KILLER-CELLS)
BEI ENTERITIS REGIONALIS (MORBUS CROHN)
UND AKUTER VIRUS B-HEPATITIS

Inauguraldissertation

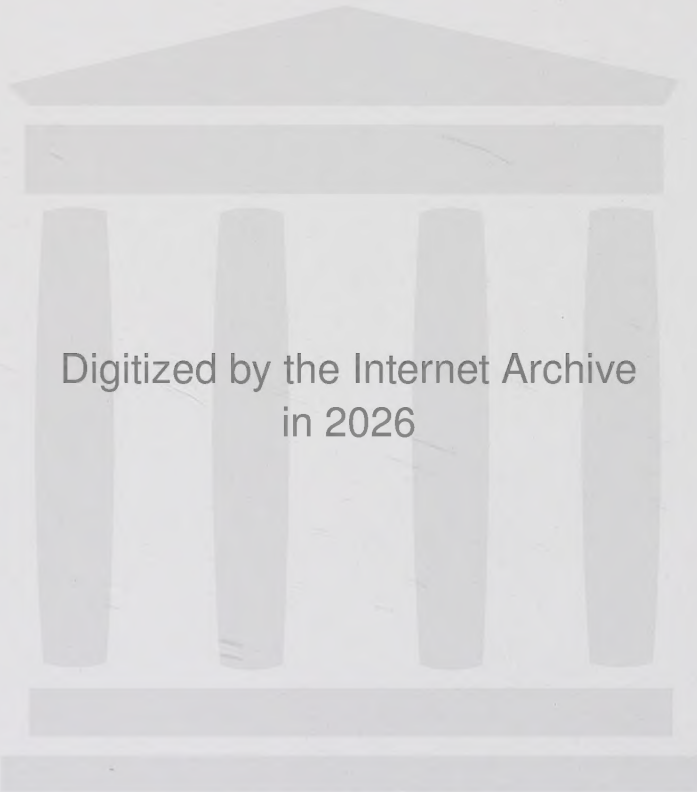
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

dem Fachbereich Medizin vorgelegt von

PETER JÜRGEN KLOOS

aus Birstein

Mainz 1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Aktivität von K-Lymphocyten (Killer-cells)
bei Enteritis regionalis (Morbus Crohn)
und akuter Virus B-Hepatitis.

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

dem Fachbereich Medizin vorgelegt von

Peter Jürgen Kloos
aus Birstein

Mainz 1981



D e k a n : Prof. Dr. med. : K.-H. Bäßler

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. med. Meyer zum
Büschensfelde

2. Gutachter: Prof. Dr. med. H.J. Gilfrich

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Okt. 1981



MEINEN ELTERN
UND
MEINER FRAU
IN DANKBARKEIT

INHALTSÜBERSICHT

	<u>Seite</u>
I. <u>EINLEITUNG</u>	1
1. Humorale Immunität	2
2. Zelluläre Immunität	3
Kweim-Antigen-Test	4
Lymphocytenanttransformationstest	4
Migrations-Inhibitionstest	5
Cytotoxizitätstest	7
II. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	13
III. <u>ERGEBNISSE</u>	21
IV. <u>ABBILDUNGEN UND TABELLEN</u>	24
V. <u>DISKUSSION</u>	28
VI. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	34
VII. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	36
VIII. <u>ANERKENNUNG</u>	54
IX. <u>LEBENS LAUF</u>	55

Aktivität von K-Lymphocyten (Killer-cells) bei Enteritis regionalis (Morbus Crohn) und akuter Virus B-Hepatitis

Peter Kloos

I. EINLEITUNG

Ätiologie und Pathogenese der Enteritis regionalis konnten bisher nicht befriedigend aufgeklärt werden. Es gibt jedoch vielversprechende Ansätze, die sich in zahlreichen Theorien und auch in der Therapie der Erkrankung niedergeschlagen haben.

Bakterien, Viren, Parasiten und Nahrungsmittelantigene wurden als pathogenetische Faktoren diskutiert, ohne daß es gelang, die Ätiologie der Erkrankung zu enthüllen. Die Forschung der letzten Jahre hat sich auf den immunologischen Sektor verlagert; hier scheinen am ehesten neue Erkenntnisse möglich.

Schon die histologischen Phänomene der Erkrankung weisen auf immunologische Prozesse hin: Im akuten Stadium sind Mukosa und Submukosa entzündlich ödematös aufgetrieben, im entzündlichen Exsudat findet man zahlreiche Lymphocyten und Plasmazellen, auch eosinophile Granulocyten; neutrophile Granulocyten sind dagegen spärlich. Bei längerem Verlauf entwickeln sich in allen Wandschichten herdförmige Lymphocyteninfiltrate und Epitheloidzellgranulome, häufig mit mehrkernigen Riesenzellen.

Auch die extraintestinalen Begleitkrankheiten des M.Crohn unterstreichen den immunologischen Charakter der Erkrankung: Arthritiden, Erythema nodosum, Uveitis und Cholangiolitis. Dies wird nicht zuletzt auch durch die Erfolge der immunsuppressiven Therapie erhärtet (18,4).

Erste immunologische Untersuchungen auf humoraler Ebene wurden bei Patienten mit Colitis ulcerosa (16) und später bei M. Crohn (56) durchgeführt.

1. Humorale Immunität

Harrison (42) und Wright und Truelove (122) versuchten ohne Erfolg, mit fluoresceinmarkiertem Antihumanglobulin Antikörper gegen humanen Dünn- und Dickdarm im Serum von Crohn-Patienten nachzuweisen. Bei etwa 15% der Patienten mit Colitis ulcerosa (C.u.) konnten Antikörper festgestellt werden. Perlmann et al. (77) verwiesen auf die Unzulänglichkeit von Colon-Darmmaterial des Erwachsenen mit seiner Fülle an Bakterien und Zellantigenen. Er konnte mit Extrakten aus keimfreiem Rattencolon als Antigen im Haemagglutinationstest (HA-Test) in der Mehrzahl der Fälle erhöhte Ak-Titer im Serum der an M.Crohn (M.C.) erkrankten Patienten gewinnen. Der Nachweis humoraler Antikörper gelang nicht, wenn Darmmaterial vom Erwachsenen als Antigen verwendet wurde. Lagercrantz et al. (56) wiesen mit Antigen aus keimfreiem Rattencolon Antikörper gegen Zökum und Faeces im HA-Test und mittels der Immunfluoreszenztechnik bei 67% der Crohn-Patienten nach.

Deodhar et al. (26) fanden bei 71% und Thayer et al. (101) bei 30% Antikörper (HA-Test). Auch sie untersuchten keimfreies Rattencolon, forschten aber nach der Existenz von Immunglobulinen gegen Colonzellen. Auch gegen Common Antigen, ein enterobakterielles Oberflächenantigen, welches Kreuzantigene mit Darmepithelien aufweist (77, 78), lassen sich Antikörper nachweisen (101, 16). Die Existenz von Antikörpern gegen Darmzellen bei M.C. läßt sich jedoch nicht differentialdiagnostisch zur Abgrenzung der C.u. heranziehen, da die positiven Resultate hier etwa in der gleichen Größenordnung liegen. Die erzielten Ergebnisse sind jedoch spezifisch: Gesunde Kontrollpersonen sind weitgehend frei von Darmantikörpern; bei Darmerkrankungen anderer Genese waren die Ergebnisse im Vergleich mit den oben untersuchten Krankheiten signifikant erniedrigt.

Nahrungsmittelantigene scheinen im Gegensatz zur C.u. bei M.C. pathogenetisch keine Rolle zu spielen (99, 100). Green und Fox (38) postulieren eine tiefe Durchdringung der Darmschleimhaut mit einer Vielzahl von Bakterien und Antigenen in Regionen mit lokalem IgA-Mangel. Interessant ist dabei die Beobachtung, daß sich durch Teilung des Fäkalstroms mit Hilfe einer doppelläufigen Ileostomie häufig Remissionen erzielen ließen (106, 74), meist traten nach Reanastomosierung keine Rückfälle auf. Ähnliche Beobachtungen machten Aufses und Kreel (3). Shorter und Dykes veranlaßte dies zu der These, daß sich bei Patienten mit M.C. eine spezifische Allergie gegenüber einer Substanz entwickle, die möglicherweise bakterieller Natur sei und sich im Darmlumen befinde (95, 27, 28).

2. Zelluläre Immunität

Eine Überprüfung der zellulären Immunität bei M.C. und C.u. erfolgte mit folgenden Methoden:
Hautteste mit Tuberkulin (Mendel-Mantoux), Kweim-Antigen und Dinitrochlorobenzen, Lymphocytenanttransformationstest in vitro, Migrations-Inhibitionstest in vitro und Cytotoxizitätstest in vitro.

Mendel-Mantoux-Test (intradermale Tuberkulininjektion). Williams (117) untersuchte Crohn-Patienten mit Hilfe des Mendel-Mantoux-Tests und fand eine signifikant verringerte Anzahl positiver Reaktionen im Vergleich mit gesunden Kontrollen. Ähnliche Ergebnisse waren von Blackburn, Hadfield und Hunt (12) und Phear (82) erzielt worden. Während Jones et al. (52) die Ergebnisse dieser Untersuchungen bestätigten, fanden Fletcher und Hinton (33) und später Röpke (88) dafür keine Beweise.

Kweim-Antigen-Test

Intradermale Injektionen eines Extraktes aus einem Sarkoidosegranulom, das meist aus der Milz eines erkrankten Patienten gewonnen wird, führt in der Mehrzahl der Fälle (etwa 80%) zur Entwicklung eines lokalen sarkoiden Knötchens. Der Test ist hochspezifisch für die Sarkoidose. Die Ähnlichkeit des histologischen Bildes der Enteritis regionalis mit der Sarkoidose legen die Erforschungen verwandter pathogenetischer Prozesse nahe. Williams (117) und Siltzbach (97) beobachteten nach Injektionen von Kweim-Antigen keine cutanen Reaktionen. 50% der Patienten von Mitchell et al. (70, 72) und 65% der Probanden von Karlish et al. (53) waren jedoch Kweim-positiv. Da zu den Testen nicht identisches Testmaterial verwandt wurde, sind die erheblichen Differenzen in den Ergebnissen verständlich.

Hauttest mit Dinitrochlorobenzen (DNCB)

Verrier-Jones et al. (109) immunisierten Crohn-Patienten mit DNCB. Zweidrittel entwickelten keine Hautreaktionen. Binder, Spiro und Thayer (10) hatten keine Abweichungen von der Norm festgestellt.

Lymphocytenanttransformationstest in vitro

Die blasenartige Transformation von T-Lymphocyten läßt sich an Blutzellkulturen mit folgendem Test demonstrieren: Unter dem Einfluß von Phythaemagglutinin (PHA), einem Extrakt aus der Gartenbohne, entstehen in Kulturansätzen von peripherem Venenblut innerhalb weniger Tage aus kleinen Lymphocyten große basophile Zellen. Die Umwandlung von Lymphocyten unter dem Einfluß von PHA stellt das Modell einer immunologischen Reaktion dar, wie sie in vitro auch

durch definierte Antigene (Bakterien-, Zell- und Virusantigene) hervorgerufen werden kann, wenn die Lymphocyten von einem Spender stammen, der vorher mit dem entsprechenden Antigen sensibilisiert wurde. Neben PHA sind auch eine Reihe anderer Substanzen (z. B. Pokeweed-Mitogen, Concanavalin A, Streptolysin S) in der Lage, als unspezifische Stimulantien Lymphocyten in der Kurzzeitkultur zur Blastentransformation und Mitoseaktivität anzuregen. Die zahlreichen bisher veröffentlichten Studien zur Enteritis regionalis fallen unterschiedlich aus: In 14 Arbeiten wurde neunmal normale und fünfmal reduzierte Lymphocytentransformation festgestellt. Die Ergebnisse bei C.u. weichen geringfügig ab: In zehn Arbeiten wird von acht normalen und von zwei reduzierten Reaktionen berichtet (116).

Die oben aufgeführten Hautteste und der PHA-Test ermöglichen eine Beurteilung der immunologischen Reaktionsfähigkeit des Organismus. Fehlende Hautreaktionen oder reduzierte Lymphocytentransformation ermutigten einige Autoren, bei Crohn-Kranken einen Zustand der Anergie zu postulieren. Für diese Behauptung findet sich in den divergierenden Untersuchungsergebnissen jedoch kein zwingender Beweis.

Migrations-Inhibitionstest

Neben den Hauttesten lassen sich mit dem Migrations-Inhibitionstest und dem Cytotoxizitätstest zelluläre Immunreaktionen in vitro erfassen. Sensibilisierte Lymphocyten sondern nach wiederholtem Antigenkontakt einen löslichen Wirkstoff, den sogenannten Migrations-Inhibitionsfaktor, ab. Dieser Faktor hemmt die Wanderungsfähigkeit von Leukocyten, ohne ihre sonstige Zellfunktionen einzuschränken. Er dürfte in vivo für die Leukocytenpersistenz am Ort der Antigeneinwirkung verantwortlich sein. Die Bestimmung der Migration ermöglicht Rückschlüsse auf die zelluläre Immunität.

Bendixen (7, 8) untersuchte Colon-, Jejunal- und Ileumzellantigene. Er fand eine Inhibition bei Patienten mit C.u., nicht jedoch, wenn die Lymphocytenspender an M.C. erkrankt waren. Richens et al. (86) testeten Colonextrakt und stellten eine Inhibition bei M.C. fest. Faeces als Antigen verwendete Dykes (27, 28). Eine Inhibition zeigten Patienten mit M.C., jedoch nicht an C.u. erkrankte. Sowohl Bull und Ignaczak (16) als auch Bartnik, Swarbrik und Williams (5) ermittelten eine Inhibition bei Crohn-Kranken. Sie verwendeten einen Extrakt aus *Escherichia coli* o14 (Common-Antigen). Keinen Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen konnten Watson und Martucci (115) finden. Ihnen diente *E. coli* o119:B14 als Antigen. Mit Kweim-Antigen erzielten Willoughby und Mitchell (118) eine Inhibition; sie untersuchten Leukocyten von Crohn-Kranken. Die Auswertung der an C.u. erkrankten Patienten verlief negativ. Zelluläre Immunität gegenüber Common-Antigen, Colon- und Dünndarmantigenen entwickeln Patienten mit C.u. und in weit geringerem Maße auch Crohn-Kranke. Zu diesem Ergebnis kamen Eckhardt et al. (29) bei Anwendung des Leukocyten-Migrations-Inhibitionstests. Bei nicht medikamentös therapierten Crohn-Patienten konnte interessanterweise eine stärkere Inhibition festgestellt werden als bei den immunsuppressiv behandelten Fällen.

Aus den Arbeiten geht hervor, daß zelluläre Immunreaktionen vom Typ der Migration-Inhibition und humorale Antikörper gegen Darmzellen nicht allein an der Pathogenese der Crohn'schen Erkrankung beteiligt sein können; denn diese Immunphänomene wurden auch bei der Leberzirrhose (29) beobachtet. Weder die bisher beschriebenen humoralen noch die zellulären Reaktionen reichen zur Erklärung der Pathogenese des M.C. aus.

Cytotoxizitätstest

Die Entdeckung cytotoxischer Zellen (Killer-Zellen), die direkt (84, 22, 23) oder über einen Antikörper vom Typ IgG (80, 81, 60, 30, 57, 31) eine Zielzelle nach Anlagerung zerstören (63, 73, 81, 35), erweiterte die Möglichkeiten, pathogenetische Prozesse und ätiologische Faktoren entzündlicher Darmerkrankungen in vitro zu studieren.

Perlmann und Broberger (76) beschrieben die Cytotoxizität von Leukocyten (T-Zellen), die sie aus dem peripheren Blut an C.u. erkrankter Patienten gewannen. Humane fetale Colonzellen, markiert mit radioaktivem ^{32}P und ^{14}C -Aminosäuren, wurden mit Leukocyten inkubiert, die Zunahme der Radioaktivität im Überstand in Korrelation mit dem Zelluntergang als Maß der Cytotoxizität der Leukocyten definiert: Die Cytolyse war im Vergleich zu dem Kontrollkollektiv signifikant erhöht. Zu den gleichen Ergebnissen kamen Watson, Quigley und Bolt (113, 114), die die Cytotoxizität von Lymphocyten bestimmten und eine leicht modifizierte Technik zugrunde legten.

Shorter et al. befaßten sich in einer Serie von Versuchen mit der Cytotoxizität von Lymphocyten von Patienten mit M.C. und C.u. Als Zielzellen verwendeten sie humane Colon-epithelzellen, die mit Patienten-Lymphocyten inkubiert wurden. Die Beurteilung der Vitalität der Darmzellen erfolgte durch Anfärbung mit Trypanblau:

Lymphocyten aus dem peripheren Blut von Patienten mit M.C. des Colons und C.u. waren cytotoxisch gegen humane Colonzellen, signifikant unterschieden von gesunden Kontrollen.

Wenn die Lymphocyten mit 10%igem Antithymusserum vom Pferd inkubiert wurden, war eine deutliche Reduktion der Cytotoxizität zu beobachten. Eine Inkubation der Colonzellen mit Antithymusserum verlief negativ (90). Die Lymphocyten

waren spezifisch gegen Colonepithelzellen cytotoxisch, Ileum- und Jejunumepithelzellen wurden nicht zerstört. Versuche mit Patienten anderer Magen-Darm-Erkrankungen (akute Appendicitis, akute und chronische Diverticulitis, Ulcus pepticum, Colon-Ca, unspezifische Diarrhoe) verliefen negativ. Nach Colektomie verloren die Lymphocyten ihre cytotoxischen Eigenschaften (91). Lymphocyten von gesunden Spendern zerstörten nach vorhergehender Inkubation mit einem Lipopolysaccharidextrakt aus *Escherichia coli* o119: B 14 Colonepithelzellen. Dieses Phänomen blieb nach Inkubation der Lymphocyten mit PHA und der Colonzellen mit *E. coli* und Komplement aus (92). Lymphocyten gesunder Spender lysierten humane Colonepithelzellen, wenn sie mit dem Serum an M.C. und C.u. erkrankter Patienten inkubiert wurden. Keine cytotoxische Reaktion wurde beobachtet, wenn die Lymphocyten mit dem Serum gesunder Spender, mit fetalem Kälberserum und dem Serum von Patienten 10 Tage nach Colektomie inkubiert wurden. Eine Reduktion der Cytotoxizität war zu beobachten, wenn die Lymphocyten der Patienten mit M.C. und C.u. mit Seren anderer Patienten der gleichen Erkrankung inkubiert wurden, jedoch nicht, wenn Lymphocyten und Serum von der gleichen Person stammten. Eine derartige Cytotoxizitätsdifferenz war bei Patienten mit anderen Magen-Darm-Erkrankungen und gesunden Lymphocyten Spendern nicht zu ermitteln (93).

Die Existenz eines cytophilien Antikörpers war Grundlage von Diskussionen und weiteren Untersuchungen, denn auch die zellfreien Überstände aus Inkubationen von Lymphocyten der an M.C. und C.u. erkrankten Patienten und Colonepithelzellen erwiesen sich als cytotoxisch (94). Die zellfreien Überstände folgender Kombinationen waren cytotoxisch: Lymphocyten von Patienten mit M.C. und C.u. und Colonzellen sowie Lymphocyten gesunder Spender, die nach Vorbehandlung mit dem Serum entzündlicher Darmerkrankungen (M.C. und C.u.) mit Colonepithelzellen inkubiert wurden. Eine Erhitzung des zellfreien Überstands auf 90°C erniedrigte ebenso wie Variationen des pH-Wertes die Cytotoxizität deutlich, während der Einsatz von DNase und RNase

ohne Folgen blieb. Vorbehandlung mit Trypsin reduzierte lediglich die Cytotoxizität des zellfreien Überstands einer Inkubation cytotoxischer Lymphocyten und Colonepithelzellen. Im Gegensatz zur cytolytischen Kapazität cytotoxischer Lymphocyten blieb die Cytotoxizität des zellfreien Überstands nicht auf humane Colonepithelzellen beschränkt, sondern war auch gegen humane Ileumzellen und organanalogue Zellen von der Maus wirksam. Lediglich Magenzellen von Mensch und Maus blieben unangestastet.

Shorter entwickelte folgende Hypothese:

Lymphocyten von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen sondern nach Kontakt mit Colonepithelzellen Lymphotoxin ab. Die Cytotoxizität der Lymphocyten wird wahrscheinlich durch einen cytophilan Antikörper vermittelt. Die Zerstörung der Colonepithelzellen ist jedoch unspezifisch. Sie wird infolge einer Erkennungsreaktion der cytotoxischen Lymphocyten ("Aggressor-lymphocyten") ausgelöst (95).

Weitere Untersuchungen sollen klären, ob auch die zellfreien Filtrate zerkleinerter Lymphocyten von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen cytotoxische Eigenschaften aufzuweisen haben: Die Filtrate erwiesen sich als cytotoxisch gegenüber menschlichen Colonepithelzellen. Analog zu den Versuchsbedingungen früherer Arbeiten (95) ergaben sich identische Ergebnisse (96).

Aus den Shorter'schen Arbeiten geht hervor, daß Lymphocyten von gesunden und kranken Spendern in Kombination mit homologen Antikörpern cytotoxische Eigenschaften zukommen, wobei noch nichts über die Identität der Lymphocyten ausgesagt wird. Die sog. zellfreien Überstände stellen höchstwahrscheinlich Antikörpersuspensionen dar.

Den von Perlmann und Shorter entwickelten, von Nachfolgern vielfach modifizierten cytotoxischen Tests liegen folgende Elemente zugrunde:

Die Zielzelle

Die Zielzelle ist das Erfolgsorgan der cytotoxischen Reaktion. Ihre spezifische Wahl limitiert störende Kreuzreaktionen mit cytotoxischen Zellpopulationen, die nicht von Interesse bzw. ohne Bedeutung in einem determinierten cytotoxischen System sind: Zielzelle + Antikörper + cytotoxische Effektorzelle.

Neben Colonepithelzellen (76, 90, 96) finden auch Hühner-

erythrocyten (112, 9), Schafserythrocyten (9, 22, 23, 24) und virussuperinfizierte Zellkulturen (40, 51, 57, 58) als Zielzellen im Cytotoxizitätstest Verwendung.

Die Cytolyse der Zielzellen läßt sich mit verschiedenen Techniken nachweisen:

Radioaktiv markierte Zielzellen erhöhen nach Zerstörung die Strahlung des Mediums, in dem sie inkubiert sind. Die Messung der Radioaktivitätszunahme ermöglicht die quantitative Beschreibung des Ausmaßes der cytotoxischen Reaktion. In überwiegender Mehrzahl ist das Isotop ^{51}Cr in Cytotoxizitätstests im Gebrauch (^{51}Cr -release Technik). Auf die von Shorter et al. (90, 96) angewandte Technik der Differenzierung zwischen intakten und lysierten Zellen mittels Trypanblau wurde bereits oben eingegangen.

Schließlich lassen sich die Zielzellen auch als Monolayer anordnen. Die abgelaufene cytotoxische Reaktion dokumentiert sich als umschriebener Hof im einschichtigen "Zellrasen" und findet in der quantitativen Bestimmung unter dem Lichtmikroskop ihren statistischen Niederschlag. Das von Biberfeld et al. (9) entwickelte Verfahren wird in der vorliegenden Arbeit leicht modifiziert dazu verwandt, die Aktivität cytotoxischer Zellen quantitativ zu erfassen.

Der Antikörper

Die von K-Zellen bewirkte Cytolyse der Zielzellen ist von Antikörpern abhängig (ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). Identifiziert wurden Immunglobuline vom Typ IgG (80, 81, 60, 30, 57, 31). Obwohl alle Subtypen an den cytotoxischen Reaktionen beteiligt sind (80, 64), scheint IgG4 eine dominierende Aktivität zuzukommen (64).

Cytotoxizitätstests im Virus-Tumorsystem (virusinfizierte Tumorzellkulturen) erweitern offensichtlich das Wirkspektrum der Immunglobuline; denn neben IgG wurde auch IgM als Teilnehmer an cytotoxischen Reaktionen erkannt (57, 58).

Die Aktivität von IgM ist allerdings auf das Tumorsystem beschränkt und verläuft wahrscheinlich über differente immunologische Reaktionen. Die bei Abwesenheit von IgG beobachtete spontane Cytotoxizität (84, 22, 23) ist wahrscheinlich auf membranfixiertes IgG der Zielzellen zurückzuführen.

Die K-Zellen

Untersuchungen dieser Lymphocytenpopulation bei entzündlichen Darmerkrankungen wurden bisher noch nicht durchgeführt. Sie basierten an, da Antikörper entdeckt wurden (siehe I, Humorale Immunität), die gegen Colonzellen gerichtet sind. Bisher ist es nicht gelungen, alle immunologischen Charakteristika dieser Zellen zu erfassen. Es ist erwiesen, daß neben K-Zellen auch eine Reihe anderer Zellen über cytotoxische Eigenschaften verfügen: Granulocyten (35, 76), Makrophagen (44, 112, 62, 79) und Monocyten (45, 75, 39). Vom Thymus abstammende T-Lymphocyten reagieren spezifisch (cytotoxisch) auf Zielzellantigene. K-Zellen werden durch Antikörper aktiviert (ADCC). Sie entwickeln keine Spezifität für Zielzellantigene (64).

Den Ergebnissen von Blomgren et al. (13), Cerottini et al. (19, 20) und Golstein et al. (37), die T-Zellen als cytotoxische Effektorzellen identifizierten, steht eine Fülle von Untersuchungen gegenüber, in denen die Teilnahme cytotoxischer T-Zellen an der antikörperabhängigen Cytolyse bestritten wird: (107, 41, 80, 64, 14, 119, 120, 125, 57, 46, 84, 40, 75, 22, 23).

Aus morphologischen und immunologischen Kriterien lassen sich K-Zellen eher den B-Lymphocyten zuordnen (107, 119, 9, 40, 22, 23). MacLennan schlug den Terminus "cytotoxische B-Zelle" vor (64). Zur Anlagerung des Antikörpers sind K-Zellen mit einem Fc-Rezeptor ausgestattet (73, 59, 80, 75, 46, 9, 22, 31, 85, 25). Die Entfernung Fc-positiver Zellen (54) hat eine Reduktion oder Elimination der Cytotoxizität zur Folge.

Eine Blockade des Fc-Rezeptors mit aggregiertem IgG bzw. Immunkomplexen hat den gleichen Effekt (64, 89, 69, 25, 17, 22). Die Existenz eines C'3 Rezeptors auf K-Zellen ist umstritten; C'3 wurde nachgewiesen von Van Boxel et al. (108), Pross und Jordal (84) und Biberfeld (9). Diese Befunde stehen in Widerspruch zu den Ergebnissen von Holm et al. (46), Perlmann et al. (81), Feldmann et al. (31) und Ramshaw et al. (85), die keinen Komplementrezeptor nachweisen konnten.

Im Gegensatz zu B-Lymphocyten lassen sich auf K-Zellen keine oberflächlich fixierten Immunglobuline feststellen (80, 39, 119, 40, 75, 81, 69, 85).

Forman und Möller (34) und Van Boxel et al. (108) wiesen Immunglobuline auf K-Zellen nach. Biberfeld et al. (9) quantifizierte die Zahl der IgG-positiven K-Zellen auf 5 - 25%. Diese Befunde weisen K-Zellen als eigenständige, von B-Lymphocyten differente Zellpopulation aus.

Untersuchungen zur Aktivität von K-Zellen bei anderen Erkrankungen liegen vor bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen (17), Lupus erythematoses (89), Polyarteritis nodosa, Sjögren Syndrom und rheumatoider Arthritis (121, 31), aktiver Hepatitis (103, 22), akuter Vitishepatitis (23), Alkoholleber (24) und M. Hodgkin (46).

In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Bestimmung der K-Zellaktivität sowie eine Quantifizierung von B- und T-Lymphocyten und C'3 Rezeptor-tragenden Lymphocyten im peripheren Blut von Patienten mit M. Crohn. Als Vergleichskollektive dienten leber- und darmgesunde Normalpersonen und Patienten mit entzündlichen Lebererkrankungen.

Ein Vergleich mit entzündlichen Lebererkrankungen vom Typ der Virus B-Hepatitis und HB_sAg-positiver, chronisch aktiver Hepatitis (CAH) ist naheliegend, weil bei diesen Erkrankungen in vivo membranfixiertes IgG auf den Hepatocyten nachweisbar ist (47, 67).

Antikörper- oder Immunkomplex-vermittelte cytotoxische Reaktionen sollten in der Pathogenese dieser Erkrankungen in Betracht gezogen werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Patienten

Untersucht wurden 71 Patienten mit M. Crohn im akuten Stadium ohne Therapie (n=21) sowie im chronischen Stadium unter immunsuppressiver Therapie mit Azathioprin + Prednison (n = 50), 50 Patienten mit HB_sAg-positiver Hepatitis (31 Patienten im akuten Stadium, 1. - 2. Krankheitswoche; 19 Patienten im postakuten Stadium 4 - 12 Wochen nach Krankheitsbeginn) sowie 21 Patienten mit HB_sAg-positiver CAH und 25 Patienten mit Leberzirrhose unterschiedlicher Ätiologie. 40 leber- und darmgesunde Personen dienten als Kontrollen.

2. K-Zellen

Die Bestimmung der Aktivität von K-Lymphocyten im peripheren Blut erfolgte mit Hilfe des Plaque-Tests nach Biberfeld et al. (9):

2.1 Als Zielzellen dienten Hühnererythrocyten (nick chick, HNL, Dieburg, Germany, Alter 10-20 Wochen), die durch Herzpunktion gewonnen wurden. Das Hühnerblut wurde durch Zusatz von etwas Heparin (Liquemin^R) ungerinnbar gemacht. Die Versuche wurden mit einer 5%igen Erythrocyten-Suspension in Hanks-Medium durchgeführt.

2.2 Die Herstellung des Hühnererythrocyten-Antiserums erfolgte durch Immunisierung eines Kaninchens (1 x wöchentlich 0,5 ml gepackte Hühnererythrocyten in physiologischer NaCl i.v. über 5 Wochen). Vorversuche zeigten, daß mit einer 1:2500-Verdünnung des inaktivierten Vollserums in RPMI + 15% FCS (inaktiviert) + 0,2 mMol Hepes-Puffer bei einem pH von 7,4 die höchsten Plaquezahlen zu erzielen waren.

2.3 Die menschlichen Lymphocyten wurden nach der Methode Kissmeyer-Nielsen und Kjerbye (55) aus heparinisiertem peripheren Blut gewonnen:

- a) Dem Probanden werden etwa 10 ml Blut mit einer sterilen Spritze entnommen, das Blut in einen sterilen 50 ml-Erlenmeyerkolben überführt.
- b) Zur Granulocyten-, Makrophagen- und Monocytenelimination vermischt man den Kolbeninhalt mit Eisenpulver (300 mg Eisenpulver/10 ml Blut).
- c) Der Kolben wird im Wärmeschüttelbad 10 min. bei 37° C bewegt.
- d) Man füllt ein langes steriles Reagenzglas mit 2,5 ml 5%iger Dextranlösung (M = 200 000) und vermischt die Lösung mit dem Blut; der sich entwickelnde Schaum wird mit der H₂O-Pumpe abgesaugt, das Eisenpulver bleibt im Kolben zurück.
- e) Die Erythrocytensedimentation bei 37° C im Wasserbad dauert etwa 30 Minuten.
- f) Man füllt sterile Zentrifugenröhrchen mit Ficoll-Isopaque und überschichtet mit etwa 3 ml Serum.
- g) Die Röhrchen werden bei 2500 U/min 15 Minuten zentrifugiert (Sorvalzentrifuge).
- h) Die Zwischenschicht (Gradient) wird mit der Pasteurpipette abgehoben und in sterile Spitzröhrchen überführt, in die man zuvor etwas Hanks gefüllt hat. Die Lymphocyten werden dreimal in Hanks gewaschen (1000 U/min). Anschließend fügt man zum Lymphocytsediment 1 ml Medium und zählt die Lymphocyten in der Bürker-Zählkammer. Die Konzentration der Lymphocyten wird in RPMI-FCS-Medium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Identifikation der Monocyten erfolgte durch spe-

zifische Anfärbung der endogenen Peroxidase (83), α -Naphthylesterase und durch ihre Fähigkeit, Latexpartikel zu phagozytieren. Die mit diesen Methoden untersuchten Lymphocyten-Suspensionen enthielten weniger als 1% Monocyten.

2.4 Durchführung des Plaquetests:

Petri-Schalen (35 x 10 mm, Falcon-Plastics) werden 0,5 Stunden in konzentrierter Schwefelsäure aufbewahrt und anschließend in Aqua dest. zur Entfernung aller Säurerückstände mehrmals gewässert (pH-Kontrolle).

- a) In 1,0 ml Hanks wird 0,05 mg Poly-L-Lysin (PLL) gelöst und in eine Petri-Schale mit der Pasteurpipette gefüllt. Die Schale bleibt 45 Minuten bei Zimmertemperatur stehen.
- b) Man entnimmt die PLL-Lösung mit einer Pasteurpipette und spült zwecks Entfernung eventueller Rückstände mit Hanks aus.
- c) Die Schale wird nun mit 1 ml einer 5%-igen Hühnerythrocyten-Suspension (Erythrocyten in Hanks) gefüllt, und läßt sie 45 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Die Suspension kann in beliebigen Intervallen in Schälchen bewegt werden, um eine optimale Verteilung zu erreichen.
- d) Die nicht haftenden Erythrocyten werden unter Zuhilfenahme einer Pasteurpipette mit Hanks abgewaschen. Der Monolayer ist nun fertig. Mit 1 - 2 ml Hanks bedeckt kann er im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt werden.
- e) Antihühnerythrocytenserum vom Kaninchen (s. II., 2.2) wird bei 56° C 0,5 Stunden inaktiviert und 1:2500 mit Medium verdünnt. Als Medium dient eine Lösung aus RPMI + 15% FCS (Fetales Kälberserum, 0,5 Std. bei 56° C inaktiviert) + 0,2 mMol Hepes-Puffer. Man füllt die Petri-Schale mit 1 ml der Verdünnung.

- f) Sofort danach ergänzt man mit 1 ml der Lymphocyten-Suspension ($1 \times 10^6/\text{ml}$).
- g) Die Versuchsansätze wurden 20 Stunden im CO_2 -Schränk bei 37°C inkubiert.
- h) Fixierung des Monolayers:
Man behandelt den Schaleninhalt 1 Minute mit 2,5%iger Glutaraldehydlösung (Glutaraldehyd (GA) in Aqua dest.). Anschließend wird der Inhalt verworfen und der Monolayer nochmals 10 Minuten mit GA fixiert. Nach Ausspülung mit Aqua dest. kann die Petri-Schale bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden. Die Hämolysehöfe (Plaques) wurden bei 320facher Vergrößerung im Lichtmikroskop ausgezählt. Der Mittelwert aus 20 Gesichtsfeldern pro Testansatz ging in die weiteren Berechnungen ein. Als ständige Kontrollen dienten folgende Ansätze:
- i) Monolayer + Lymphocyten-Suspension
(kein Zusatz von Antihühnererythrocytenserum).
- ii) Monolayer + Antihühnererythrocytenserum
(kein Zusatz von Lymphocyten).

Beide Kontrollen zeigten in der Regel weniger als 1 Plaque/Gesichtsfeld.

3. B-Lymphocyten

Periphere menschliche Lymphocyten wurden aus heparinisiertem Blut nach der unter II. 2.3 beschriebenen Methode separiert. Nach Inkubation bei 37°C über 30 Minuten und 3-maligem Waschen bei 37°C in TC-Medium wurden 1×10^6 Lymphocyten mit Anti-human-Ig A, M, G-FITC von der Ziege (Behring-Werke, Marburg/Lahn, Germany) für 30 Mi-

nuten bei 4° C aufbewahrt. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen und im Leitz-Orthoplan-Fluoreszenzmikroskop auf Membranfluoreszenz untersucht. Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen pro 100 Zellen entsprach der Prozentzahl der B-Lymphocyten.

4. T-Lymphocyten

1 ml einer 5%igen Suspension von Hammelerythrocyten in TC-Medium wurde über 60 Minuten bei 37° C im Wasserbad mit 0,2 ml Neuraminidase-Lösung (Behring-Werke, Marburg/Lahn, Germany) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde das Sediment auf eine 0,5%ige Erythrocyten-Suspension in TC-Medium eingestellt. 1×10^6 periphere Blutlymphocyten (Separation s. II. 2.3) wurden bei 37° C für 10 Minuten im Wasserbad mit der 0,5%igen Neuraminidasevorbehandelten Hammelerythrocyten-Suspension inkubiert und nachfolgend für 10 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Nach Inkubation des Testansatzes bei 4° C über 60 Minuten wurde das Sediment vorsichtig resuspendiert. Die Anzahl der E-Rosetten auf 100 Lymphocyten entsprach der Prozentzahl der T-Lymphocyten.

5. C'3 Rezeptor-tragende Lymphocyten

(Dr. M.P. Dierich, Institut für Mikrobiologie, Uni-Kliniken, 65 Mainz)

Eine definierte Menge sensibilisierter Schafserythrocyten (5×10^8 /ml) wurde mit 0,06%igem Glutaraldehyd behandelt und für 30 Minuten bei 37° C mit einer adäquaten Menge 1:2 verdünnten frischen, humanen Serums inkubiert, dreimal gewaschen und auf eine Konzentration von 5×10^7 /ml eingestellt. Der Ansatz wurde im Rosettentest zur Identifikation Komplement-tragender Lymphocyten eingesetzt.

50 μ l der EAC-Suspension (5×10^7 /ml TC-Medium) wurden mit 50 μ l einer humanen Lymphocyten-Suspension (1×10^6 /ml TC-Medium) für 30 Minuten bei 37° C inkubiert.

Nach Auszählung von 200 Lymphocyten ging die Anzahl der Rosetten als Prozentzahl der C'3 Rezeptor-tragenden Lymphocyten in die weiteren Berechnungen ein.

6. Gesamtlymphocyten

Die Bestimmung der Leukocyten-Zahlen erfolgte im Coulter-Counter und die der Gesamtlymphocyten mit Hilfe eines Differentialblutbildes.

7. Statistische Auswertung

Die Werte aus den verschiedenen Krankheitskollektiven und der Kontrollgruppe wurden mit Hilfe des nicht-parametrischen U-Tests nach Mann-Whitney-Wilcoxon verglichen:

Voraussetzung:

Die Zufallsvariablen X_{ij} ($j=1,2, \dots, n_i$; $i=1,2$)
sind unabhängig.

Die Zufallsvariablen $(X_{i1}, X_{i2}, \dots, X_{in_i})$ sind
identisch verteilt nach $F_i(x)$ ($i=1,2$).

Hypothesen: $H_0: F_1(x) = F_2(x)$
 $H_1: F_1(x) \neq F_2(x)$

Teststatistik:

Unter diesen Voraussetzungen ist bei Gültigkeit der Nullhypothese die Teststatistik W (Prüfgröße s.u.) eine diskrete Zufallsvariable, deren Quantile in den Tabellen tabelliert sind.

Durchführung:

Es wird vermutet, daß die Verteilungsfunktionen $F_1(x)$ und $F_2(x)$ nicht identisch sind. Zur Prüfung dieser Vermutung werden zufällige Stichproben

$$\{x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{in_i}\} \quad (i=1,2) \text{ gezogen.}$$

Die $N=n_1 + n_2$ Daten der beiden Stichproben werden zusammengefaßt und der Größe nach geordnet; dann werden die Rangzahlen $1,2, \dots, N$ zugewiesen. Ist die r -te Rangzahl nicht eindeutig einem Datum zuzuordnen, da $e > 1$ Daten gleich sind, dann ist allen e -Daten die "mittlere" Rangzahl $(r + \frac{e-1}{2})$ zuzuordnen.

Sei r_i die Summe der Rangzahlen der Daten aus der i -ten Stichprobe ($i=1,2$).

Kontrolle:
$$r_1^* + r_2^* = \frac{N}{2} \frac{(N+1)}{2}$$

Man berechnet dann
$$w_i = r_i^* - \frac{n_i}{2} \frac{(n_i + 1)}{2} \quad (i=1,2)$$

Ist die Prüfgröße
$$w = \min(w_1, w_2)$$

kleiner als das Quantil

$w_{n_1, n_2; \alpha/2}$, dann wird die Nullhypothese mit der Irrtumswahrscheinlichkeit verworfen.

Möglichkeit:
$$n_2 > 20$$

Die Verteilung der Prüfgröße U nähert sich mit wachsenden n_1, n_2 der Normalverteilung mit den Parametern

$$\mu = \frac{n_1 n_2}{2} \quad \text{und} \quad \sigma = \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}}$$

und kann für $n > 20$ durch diese ersetzt werden.

Zur Prüfung der Nullhypothese hat man dann den normierten U -Wert mit dem der Irrtumswahrscheinlichkeit α entsprechenden kritischen Wert u_α der normierten Gauß'schen Verteilung zu vergleichen:

$$u = \frac{U - \mu}{\sigma} = \frac{U - \frac{n_1 n_2}{2}}{\sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}}}$$

Bei der statistischen Entscheidung wird der Absolutbetrag des berechneten u -Wertes zugrunde gelegt.

Kriterium: Wenn $|u| < u_\alpha$, dann Annahme von H_0 ,
wenn $|u| \geq u_\alpha$, dann Zurückweisung von H_0 .

Für $\alpha = 0,01$: $u_\alpha = 2,58$.

III. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 und in den Tabellen 1 und 2 zusammengefaßt.

Gesamtlymphocytenzahlen

Die absolute Lymphocytenzahl war signifikant erhöht bei Patienten mit akuter Virus B-Hepatitis ($p < 0,05$), sie war erniedrigt bei Patienten mit immunsuppressiv behandeltem M. Crohn, HB_sAg-positiver CAH und Leberzirrhose im Vergleich mit gesunden Kontrollen ($p < 0,05$ und $p < 0,01$ siehe Tab. 1). Patienten mit postakuter Virus B-Hepatitis und akutem unbehandeltem M. Crohn unterschieden sich nicht von den Kontrollen ($p > 0,05$, Tab. 1).

B-Lymphocyten

Die relativen und absoluten B-Lymphocytenzahlen lagen in der Kontrollgruppe bei 8% bzw. $0,14 \times 10^3/\text{mm}^3$. Patienten mit aktivem unbehandeltem M.C., immunsuppressiv behandeltem M.C., akuter HB_sAg-positiver Hepatitis, postakuter Virus B-Hepatitis (4. - 12. Krankheitswoche), HB_sAg-positiver CAH sowie mit Leberzirrhose unterschiedlicher Ätiologie zeigten relativ wie absolut erniedrigte B-Lymphocytenwerte (Tab. 1). Der statistische Vergleich erbrachte signifikante Unterschiede zwischen dem Kontrollkollektiv und den genannten Krankheitsgruppen ($p < 0,01$, Tab. 1).

T-Lymphocyten

Die relativen und absoluten T-Lymphocytenzahlen lagen in der Kontrollgruppe bei 66% bzw. $1,29 \times 10^3/\text{mm}^3$. Die relative Zahl der T-Lymphocyten war lediglich bei Patienten mit HB_sAg-positiver CAH und Leberzirrhose erniedrigt ($p < 0,05$, Tab. 1). In den anderen Gruppen bestand kein Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen. Die absolute Zahl zeigte jedoch einen signifikant erniedrigten Wert bei Patienten mit immunsuppressiv behandeltem M.C. und HB_sAg-positiver CAH im Vergleich mit gesunden Kontrollen ($p < 0,01$, Tab. 1).

Die Ergebnisse bei Patienten mit aktivem unbehandeltem M.C., akuter HB_SAg-positiver Hepatitis, postakuter Virus-B-Hepatitis und Leberzirrhose unterschieden sich nicht von normalen Kontrollen.

K-Lymphocyten

Patienten mit M.C., akuter HB_SAg-positiver Hepatitis, HB_SAg-positiver CAH und Leberzirrhose haben eine gegenüber Normalpersonen signifikant erhöhte K-Zellenaktivität ($p < 0,01$, Tab. 1 und Abb. 1). Die höchsten K-Zellenwerte zeigten Patienten mit akuter HB_SAg-positiver Hepatitis in der 1. - 2. Krankheitswoche (9,0 Plaques / Gesichtsfeld) sowie Patienten mit aktivem unbehandeltem M.C. (10,3 Plaques / Gesichtsfeld) gegenüber 3,9 Plaques / Gesichtsfeld bei Normalpersonen, während in den Gruppen mit immunsuppressiv behandeltem M.C., HB_SAg-positiver CAH und Leberzirrhose lediglich gering erhöhte K-Zellenaktivitäten beobachtet wurden ($p < 0,01$, Tab. 1). In der posthepatitischen Phase (4. - 12. Krankheitswoche) fielen die K-Zellenwerte mit 4,40 Plaques / Gesichtsfeld wieder auf Normwerte ab ($p > 0,05$).

Vergleicht man die K-Zellaktivitäten in den verschiedenen Krankheitskollektiven untereinander, so ist hervorzuheben, daß signifikante Unterschiede zwischen aktivem unbehandeltem M.C. und immunsuppressiv behandeltem M.C. bestehen, desgleichen zwischen akuter Virus B-Hepatitis (1. - 2. Krankheitswoche) und HB_SAg-positiver CAH sowie der posthepatitischen Phase (4. - 12. Krankheitswoche $p < 0,01$). Dagegen werden die K-Zellenaktivitäten bei akuter HB_SAg-positiver Hepatitis und aktivem unbehandeltem M.C. statistisch nicht signifikant unterschieden ($p > 0,05$).

C'3 Rezeptor-tragende Lymphocyten

Die relativen und absoluten Werte für C'3 Rezeptor-tragende Lymphocyten lagen in der Kontrollgruppe bei 12% bzw. $0,26 \times 10^3/\text{mm}^3$ (Tab. 2). Patienten mit M.C., HB_sAg-positiver CAH und Leberzirrhose zeigten statistisch signifikant erniedrigte Relativ- und Absolutwerte ($p < 0,05$ und $p < 0,01$).

Eine nur relative Abnahme der C'3-Werte ergab sich in Patientengruppen mit akuter HB_sAg-positiver Hepatitis (1. - 2. Krankheitswoche) und postakuter Hepatitis (4. - 12. Krankheitswoche).

IV. ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Abbildung 1

Plaque-Zahlen pro Gesichtsfeld im Plaque-Test bei Kontrollpersonen sowie Patienten mit M. Crohn und entzündlichen Lebererkrankungen.

Darstellung der Einzelergebnisse.

Auf der Ordinate wird die Anzahl der Plaques/Gesichtsfeld angegeben.

m = Median

Tabelle 1

Gesamtlymphocyten und Lymphocytensubpopulationen von Normalpersonen, Patienten mit M. Crohn und entzündlichen Lebererkrankungen.

Darstellung der Mediane.

$1 \times 10^3 / \text{mm}^3$

² Anzahl der Plaques pro Gesichtsfeld.

NS = Nicht signifikant in Mann-Whitney-Wilcoxon's U-Test ($p > 0,05$)

Tabelle 2

C'3 Rezeptor-tragende Lymphocyten im peripheren Blut bei Normalpersonen, Patienten mit M. Crohn und entzündlichen Lebererkrankungen.

Darstellung der Mediane.

$1 \times 10^3 / \text{mm}^3$

NS = Nicht signifikant in Mann-Whitney-Wilcoxon's U-Test ($p > 0,05$)

Abbildung 1

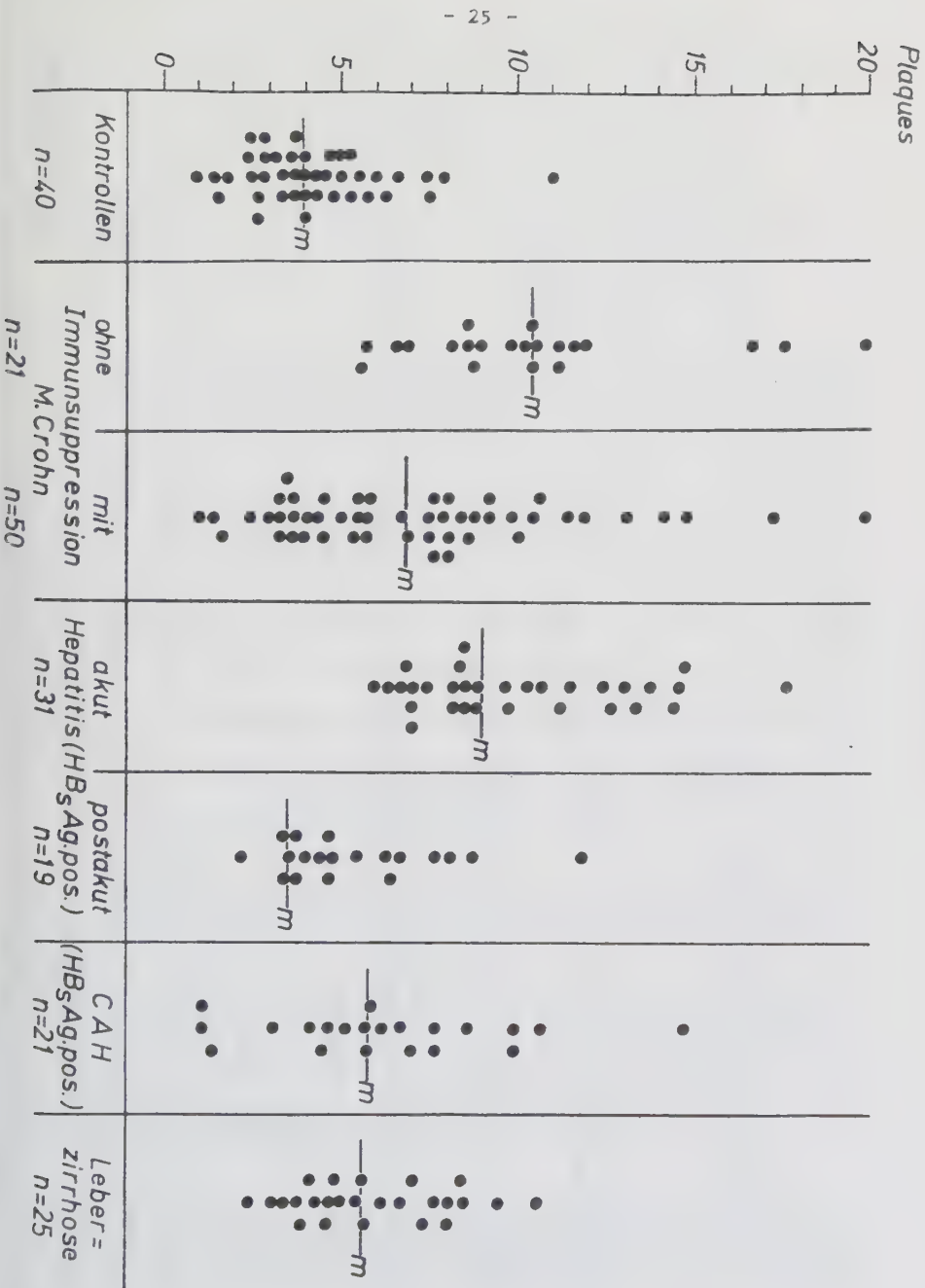


Tabelle 1

	Lymphocyten		B-Lymphocyten		T-Lymphocyten		K-Zellen
	N	absolut ¹	%	absolut ¹	%	absolut ¹	Plaques ²
Kontrollen	40	1,93	8	0,14	66	1,29	3,90
Hepatitis(akut) HBs Ag - pos.	31	2,20 $p < 0,05$	2 $p < 0,01$	0,05 $p < 0,01$	63 NS	1,45 NS	9,0 $p < 0,01$
Hepatitis (postakut)	19	1,84 NS	3 $p < 0,01$	0,06 $p < 0,01$	66 NS	1,18 NS	4,40 NS
M. Crohn ohne Immunsuppression	21	2,0 NS	3 $p < 0,01$	0,06 $p < 0,01$	65 NS	0,94 NS	10,30 $p < 0,01$
M. Crohn mit Immunsuppression	50	1,48 $p < 0,05$	4 $p < 0,01$	0,07 $p < 0,01$	62 NS	0,88 $p < 0,01$	6,85 $p < 0,01$
Chronisch aktive Hepatitis(HBs Ag-pos.)	21	1,40 $p < 0,05$	3 $p < 0,01$	0,04 $p < 0,01$	54 $p < 0,05$	0,74 $p < 0,01$	5,70 $p < 0,01$
Leberzirrhose	25	1,12 $p < 0,01$	3 $p < 0,01$	0,05 $p < 0,01$	59 $p < 0,05$	0,68 NS	5,50 $p < 0,01$

Tabelle 2

	<i>N</i>	%	<i>absolut</i> ¹
<i>Kontrollen</i>	41	12	0,26
<i>Hepatitis (akut)</i> <i>HB_s Ag-pos.</i>	15	8 <i>p<0,05</i>	0,19 <i>NS</i>
<i>Hepatitis</i> <i>(postakut)</i>	12	7 <i>p<0,01</i>	0,21 <i>NS</i>
<i>M. Crohn</i> <i>ohne Immunsuppression</i>	16	9 <i>p<0,01</i>	0,16 <i>p<0,05</i>
<i>M. Crohn</i> <i>mit Immunsuppression</i>	45	9 <i>p<0,01</i>	0,11 <i>p<0,01</i>
<i>Chronisch aktive</i> <i>Hepatitis (HB_s Ag-pos.)</i>	8	7 <i>p<0,01</i>	0,10 <i>p<0,01</i>
<i>Leberzirrhose</i>	19	8 <i>p<0,05</i>	0,12 <i>p<0,05</i>

V. DISKUSSION

Nach den Untersuchungen von Biberfeld et al. (9) läßt sich der Plaquetest zur Charakterisierung einer Antikörper-abhängigen Cytotoxizität von Lymphocyten mit Hilfe eines Monolayers heranziehen. Des weiteren scheint er auch zur Quantifizierung von K-Zellen verwendet werden zu können.

Wie im Kapitel I ausgeführt wurde, sind neben K-Zellen auch andere Zellpopulationen in der Lage, an cytotoxischen Reaktionen mitzuwirken. Nach Zusatz von Eisenpulver enthielten die in dieser Studie verwendeten Lymphocyten jedoch weniger als 1% Monocyten und Granulocyten. Ohne Vorbereitung lagen die Monocytenwerte bzw. Plaquezahlen um ca. 20 - 30% höher (s. II., 2.3 h). Die Untersuchungen zeigen, daß Patienten mit aktivem, unbehandeltem M. Crohn und akuter HB_sAg-positiver Hepatitis hohe K-Zellaktivitäten im peripheren Blut besitzen (Abb. 1, Tab. 1). Neben einer T-Zell-vermittelten zellulären Immunität gegenüber Darmantigenen und Common-Antigen ist die Existenz einer ADCC bei M. Crohn pathogenetisch in Erwägung zu ziehen. Es ist anzunehmen, daß Antikörper lokal durch Komplementaktivierung oder mit Hilfe von K-Lymphocyten gegenüber Darmepithelien oder Zellen mit angelagertem Common-Antigen cytotoxisch reagieren (104). Die Antigenspezifität dieser immunologischen Reaktion ist bisher noch nicht geklärt. Die Charakterisierung der bei M. Crohn auftretenden Immunkomplexe (49) ist hierfür ein erster Schritt. Entsprechende Untersuchungen brachten zutage, daß diese Ag-Ak-Komplexe kein Common-Antigen enthielten (Eckhardt et al. in Vorbereitung). Die pathogenetische Bedeutung zirkulierender Immunkomplexe für den M. Crohn ist noch weitgehend unklar. Möglicherweise kommt es infolge vermehrter Aufnahme von antigenem Material mit daraus resultierender lokaler Antikörperproduktion in der Darmschleimhaut zur Entstehung von Immunkomplexen, die für das Krankheitsbild

im Darm bzw. für die Ausbildung der extraintestinalen Symptome verantwortlich sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß zwischen den hohen K-Zellaktivitäten bei akutem unbehandeltem M. Crohn und den bei akuter HB_sAg-positiver Hepatitis gemessenen Werten kein signifikanter Unterschied besteht (Tab. 1). Es ist somit anzunehmen, daß beiden Erkrankungen ein verwandter immunologischer Reaktionsablauf zugrunde liegt. Weitere Untersuchungen müßten prüfen, ob im Zusammenhang mit der in letzter Zeit häufig diskutierten Virusätiologie des M. Crohn (6, 1, 71) Virusinfektionen charakteristischerweise hohe K-Zellaktivitäten aufweisen. Bisher ist bekannt, daß Seren von Epstein-Barr-Virus (EBV)-positiven Personen bzw. von Erwachsenen mit anamnestisch bekannter Mumps Antikörper enthalten, die eine ADCC gegenüber EBV- bzw. Mumps-Virus-superinfizierten Zielzellen auslösen können (51, 40).

Eine hohe K-Zellaktivität bei akuter Virus B-Hepatitis wurde auch von Cochrane et al. (23) nachgewiesen. Als Zielzellen dienten radioaktiv markierte Hepatocyten. In Übereinstimmung mit den Befunden dieser Arbeit kam es zum signifikanten Abfall der K-Zellaktivität in der postakuten Phase der Erkrankung. Zwar gab es keine Unterschiede zwischen HB_sAg-positiven und-negativen Fällen in der akuten Phase der Erkrankung; die Cytotoxizität der Lymphocyten der HB_sAg-positiven Patienten war in der postakuten Phase jedoch höher als die der HB_sAg-negativen.

Die Untersuchungen zeigen, daß bei M. Crohn und entzündlichen Lebererkrankungen die Gesamtlymphocyten im Bereich der Norm liegen (Tab. 1). Es konnte weiter nachgewiesen werden, daß Patienten mit aktivem unbehandeltem M. Crohn und akuter HB_sAg-positiver Hepatitis normale

T-Lymphocytenzahlen im peripheren Blut aufweisen. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen von Bird und Britton (11) sowie Thayer et al. (102) bei Crohn-Kranken, er ist jedoch mit dem Nachweis erniedrigter T-Lymphocytenzahlen bei Virus B-Hepatitis und M. Crohn in den Arbeiten von Edington und Chisari (30) bzw. Strickland et al. (98) nicht zu vereinbaren.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit sowie der vorliegenden Literatur kann der schlüssige Beweis einer immer wieder im Zusammenhang mit der Pathogenese des M. Crohn diskutierten T-Zellenschwäche (116) bisher nicht erbracht werden. Der Nachweis zellulärer Immunreaktionen gegenüber Darmantigenen im Leucocyten-Migrations-Inhibitionstest (29, 86) weist eher auf eine ungestörte Funktion dieser Lymphocytenpopulation bei Crohn-Kranken hin. Die Resultate der Hauttestungen mit BCG und DNCB sowie Stimulation mit PHA und anderen Mitogenen erbrachten, wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, durchweg widersprüchliche Ergebnisse. Immerhin wäre eine funktionelle T-Zellenschwäche bei zumindest einigen Crohn-Kranken zu diskutieren, ohne daß ihr eine wesentliche pathogenetische Bedeutung zukommen sollte, da auch abgeschwächte PHA-Stimulation bei Patienten mit Proteinunterernährung beschrieben worden ist (11, 32, 66).

Aus den Arbeiten von Shorter et al. (90, 91, 92, 93, 94, 95, 96) geht hervor, daß neben K-Zellen Immunglobuline ("cytophiler Antikörper") bzw. Immunkomplexe an cytotoxischen Reaktionen gegen Darmschleimhaut beteiligt sind. Ihnen scheint eine dominierende Rolle zuzukommen, da auch gesunde Probanden über K-Zellen verfügen, die nach Inkubation mit Seren bzw. zellfreien Überständen an M. Crohn und C.u. leidender Patienten cytotoxische Reaktionen zeigten.

Neuere Untersuchungen von Lobo et al. (61) weisen zwei Populationen Immunglobulin-tragender Lymphocyten gesunder Spender nach:

Eine Population mit oberflächenstabilen Ig-Determinanten (Vorinkubation und Waschung der Zellen bei 37° C vor der Färbung, Mittelwert 9%); der anderen Lymphocytengruppe fehlen diese Marker, sie verfügt jedoch über die Fähigkeit, exogenes IgG zu binden (Mittelwert 22%). Die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Studie wurden bei 37° C durchgeführt. Der in der Kontrollgruppe ermittelte Wert von 8% B-Lymphocyten entspricht somit der in der Arbeit von Lobo et al. (61) nachgewiesenen Lymphocytenpopulation mit oberflächenstabilen Ig-Determinanten.

Die bei Patienten mit entzündlichen Lebererkrankungen und M. Crohn nachgewiesene Erniedrigung peripherer B-Lymphocyten steht mit neueren Untersuchungen an Crohn-Kranken durch Høj und Sørensen (43) in Einklang. Ob dieses Verhalten mit einer Erhöhung der K-Zellen im peripheren Blut korreliert, kann bisher nicht beantwortet werden.

Aus Tabelle 2 geht hervor, daß die Absolutzahlen für C'3 Rezeptor-tragende Lymphocyten bei immunsuppressiv behandeltem M. Crohn und HB_sAg-positiver CAH signifikant erniedrigt sind ($p < 0,01$). Die Werte der Kollektive mit HB_sAg-positiver Hepatitis, aktivem unbehandeltem M. Crohn, postakuter Hepatitis (4. - 12. Krankheitswoche) und Leberzirrhose unterscheiden sich nicht signifikant vom Kontrollkollektiv.

Der bei entzündlichen Lebererkrankungen und M. Crohn beschriebene Abfall der B-Lymphocyten und die damit verbundene Reduktion von C'3 Rezeptor-tragenden Lymphocyten wird wahrscheinlich durch einen entsprechenden Anstieg von K-Zellen, die über C'3-Rezeptoren verfügen (108, 84, 9), kompensiert.

Die bei Patienten mit M. Crohn unter Immunsuppression nachgewiesene signifikante Erniedrigung peripherer T-Lymphocyten (Tab. 1) und der bei immunsuppressiv behandelten Crohn-Patienten im Vergleich zur unbehandelten Gruppe nachweisbare signifikante Rückgang peripherer K-Zellen (Abb. 1, Tab. 1) muß als spezifischer Effekt von Azathioprin und Prednison auf diese Lymphocyten-Subpopulation gedeutet werden. Analoge Befunde liegen bisher von Cambell et al. (18) sowie Röllinghof et al. (87) bezüglich eines Azathioprin-Effektes auf K-Zellen bzw. T-Zellen und von Balow et al. (4) bezüglich eines Langzeiteffektes von Glucocorticoiden auf die zellvermittelte Immunität vor.

In der Diskussion der Pathogenese des M. Crohn kommt dem Nachweis einer auf humoraler und zellulärer Ebene bestehenden Autoimmunität gegenüber Antigenen aus der Darm-schleimhaut ohne Zweifel eine zentrale Bedeutung zu. Die bei Crohn-Kranken nachweisbare zelluläre Immunität gegenüber intestinalen Antigenen ist möglicherweise Symptom einer echten Toleranzdurchbrechung.

Wahrscheinlich wird der Bruch der Immuntoleranz durch kreuzreagierende bakterielle Antigene, wie z.B. Common-Antigen und andere noch nicht näher differenzierte Antigene, eingeleitet. Allerdings ist es bisher noch nicht gelungen, die zur Toleranzdurchbrechung führenden Faktoren näher zu bestimmen. Denkbar wäre eine angeborene oder erworbene Dysfunktion der physiologischen Schleimhautbarriere, die unter bestimmten Voraussetzungen zur vermehrten Absorption von bakteriellen und anderen Antigenen aus dem Darmlumen in die Darmwand führt. Hier wären speziell Änderungen der physiologischen Darmbakterienflora und transitorische Enteritiden zu nennen. Die Beobachtung der Erkrankungszunahme des M. Crohn in der westlichen Welt (68) weist auf ernährungsphysiologische

Faktoren hin. Es ist bekannt, daß Patienten mit M. Crohn vermehrt Produkte aus raffinierten Kohlehydraten konsumieren (65). Es wäre zu diskutieren, ob diese direkt oder über eine Dysbakterie zu einer gesteigerten Aufnahme von Substanzen aus dem Darmlumen bei prädisponierten Personen führen.

Die in dieser Arbeit beschriebenen immunologischen Reaktionen sind mit dem für die Crohn'sche Erkrankung typischen Gewebsbild einer transmuralen Entzündung mit Riesenzellgranulomen, multiplen Schleimhautdefekten sowie dem Nachweis einer erhöhten Zahl IgA-, IgG- und IgM-produzierender Zellen in der Darmwand vereinbar. Die Symptomatik der Erkrankung legt die Vermutung nahe, daß durch eine einmal abgelaufene Entzündung in der Darmwand eine weitere Progredienz der Erkrankung programmiert wird, mit einer weiteren Schädigung der Schleimhautbarriere und konsekutiver permanenter Aufnahme von antigenem Material aus dem Darmlumen.

Der Nachweis zirkulierender Immunkomplexe und die Beobachtung einer weiterbestehenden verzögerten Immunität gegenüber intestinalen Antigenen scheint diese Vermutung zu stützen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie erfolgte die Bestimmung der Aktivität von K-Lymphocyten, der Anzahl der Gesamtlymphocyten, B- und T-Lymphocyten sowie der C'3 Rezeptor-tragende Lymphocyten im peripheren Blut von Patienten mit akuter und postakuter HB_sAg-positiver Hepatitis, HB_sAg-positiver chronisch aggressiver Hepatitis, Leberzirrhose und M. Crohn.

Mit Hilfe des Plaque-Tests nach Biberfeld et al. (9) zeigten sich erhöhte K-Zellaktivitäten bei Patienten mit M. Crohn, akuter HB_sAg-positiver Hepatitis, HB_sAg-positiver CAH und Leberzirrhose gegenüber Normalpersonen. Die höchsten K-Zellenwerte fanden sich bei Patienten mit akuter HB_sAg-positiver Hepatitis und Patienten mit aktivem unbehandeltem M. Crohn; in den Gruppen mit immunsuppressiv behandeltem M.C., HB_sAg-positiver CAH und Leberzirrhose wurden lediglich gering erhöhte K-Zellaktivitäten beobachtet.

Die absolute Lymphocytenzahl war bei Patienten mit akuter Virus B-Hepatitis erhöht, bei Patienten mit immunsuppressiv behandeltem M.C., HB_sAg-positiver CAH und Leberzirrhose erniedrigt.

Relativ wie absolut erniedrigte B-Lymphocytenzahlen waren bei Patienten mit aktivem unbehandeltem M.C., immunsuppressiv behandeltem M.C., akuter HB_sAg-positiver Hepatitis, postakuter Virus B-Hepatitis, HB_sAg-positiver CAH sowie Leberzirrhose zu beobachten.

Die relative Zahl der T-Lymphocyten war bei Patienten mit HB_sAg-positiver CAH und Leberzirrhose erniedrigt, absolut waren die T-Lymphocyten lediglich bei immunsuppressiv behandeltem M.C. und HB_sAg-positiver CAH erniedrigt.

C'3 Rezeptor-tragende Lymphocyten waren bei Patienten mit M.C., HB_sAg-positiver CAH und Leberzirrhose relativ wie absolut erniedrigt, jedoch nur relativ in den Gruppen mit HB_sAg-positiver akuter und postakuter Hepatitis.

Aus der Studie geht hervor, daß eine ADCC in der Pathogenese der Crohn'schen Erkrankung diskutiert werden muß. Denkbar wäre eine lokale Reaktion von Antikörpern mit Darmepithelien mittels Komplementaktivierung oder mit K-Lymphocyten.

Hohe K-Zellaktivitäten bei akutem unbehandeltem M.C. und akuter HB_sAg-positiver Hepatitis legen den Schluß nahe, daß

beiden Erkrankungen ein verwandter immunologischer Reaktionsablauf zugrunde liegt. Der schlüssige Beweis einer T-Zellenschwäche bei M.C. kann in der vorliegenden Arbeit nicht erbracht werden. Inwieweit die Erniedrigung peripherer B-Lymphocyten bei Patienten mit entzündlichen Lebererkrankungen und M.C. in Beziehung steht zu einem Anstieg der K-Lymphocyten im peripheren Blut, läßt sich nicht definitiv beantworten. Vermutlich kommt es zu einer Kompensation, da sowohl K-Zellen als auch B-Lymphocyten über C'3 Rezeptoren verfügen.

In der Diskussion der Pathogenese des M.C. kommt der Autoimmunität gegenüber Antigenen aus der Darmschleimhaut ohne Zweifel eine ganz wesentliche Bedeutung zu. Die zum Bruch der Immuntoleranz führenden Faktoren konnten bisher noch nicht eindeutig bestimmt werden. Diskutiert wird eine Dysfunktion der physiologischen Schleimhautbarriere, wobei es zu Beginn der Darmläsion wahrscheinlich zu einer Reaktion kreuzreagierender bakterieller Antigene (z.B. Common Antigen) und weiterer, bisher noch nicht näher definierter Antigene mit dem Immunsystem kommt, die dann nach initialer Schädigung in einen chron. entzündlichen Prozess mündet.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Aronson, M.D., Beeken, W.L., Forsyth, B.:
Isolation and characterization of a viral agent from intestinal tissue of patients with Crohn's disease and other chronic intestinal disorder.
Prog. Med. Virol. 21, 165 - 173 (1975).
- 2) Asquith, P., Thompson, R.A., Cooke, W.T.:
Quantitation of serum secretory IgA in gastro-intestinal disease.
Clin. Research 19, 562 - 569 (1971).
- 3) Aufses, A.H., Kreel, J.:
Ileostomy for granulomatous ileocolitis.
Ann. Surg. 173, 91 - 96 (1971).
- 4, Balow, J.E., Hurley, D.L., Fauci, A.S.:
Immunosuppressive effects of glucocorticoids:
Differential effects of acute vs chronic administration on cell-mediated immunity.
Clin. Exp. Immunol. 22, 139 - 152 (1975).
- 5) Bartnik, W., Swarbrick, E.t., Williams, Ch.:
A study of peripheral migration in agarose medium in inflammatory bowel disease.
Gut 15, 291 - 300 (1974).
- 6) Beeken, W.L., Mitchell, D.N., Cave, D.R.:
Evidence for a transmissible agent in Crohn's disease.
Clin. Gastroenterol. 5, 289 - 302 (1976).
- 7) Benedixen, G.:
Specific inhibition of the in vitro migration of leukocytes in ulcerative colitis and Crohn's disease.
Scand. J. Gastroenterol. 2, 214 - 221 (1967).

- 8) Bendixen, G.:
Cellular hypersensitivity to components of intestinal mucosa in ulcerative colitis and Crohn's disease.
Gut 10, 631 - 636 (1969).
- 9) Biberfeld, P. Wahlin, B., Perlmann, P. Biberfeld, G.:
A plaque technique for assay and characterization of antibody-dependent cytotoxic effector (K) cells.
Scand. J. Immunol. 4, 859 - 864 (1975).
- 10) Binder, H.J., Spiro, H.M., Thayer, W.R.:
Delayed hypersensitivity in regional enteritis and ulcerative colitis.
Amer. J. Dig. Dis. 11, 572 - 574 (1966).
- 11) Bird, A.G., Britton, S.:
No evidence for decreased lymphocyte reactivity in Crohn's disease.
Gastroenterol. 67, 926 - 932 (1974).
- 12) Blackburn, G., Hadfield, G., Hunt, A.H.:
Regional ileitis, St. Bartholomew's Hospital.
Reports 72, 181 - 224 (1939).
- 13) Blomgren, H., Takasugi, M., Friberg, S.:
Specific cytotoxicity by sensitized mouse thymus cells on tissue culture target cells.
Cell. Immunol. 1, 619 - 625 (1970).
- 14) Britton, S., Perlmann, H., Perlmann, P.:
Thymus-dependent and thymus-independent effector functions of mouse lymphoid cells. Comparison of cytotoxicity and primary antibody formation in vitro.
Cell. Immunol. 8, 420 - 434 (1973).

- 15) Broberger, C., Perlmann, P.:
Autoantibodies in human ulcerative colitis.
J. Exp. Med. 110, 657 - 674 (1959).
- 16) Bull, D.M., Ignaczak, T.F.:
Enterobacterial Common Antigen-induced lymphocyte
reactivity in inflammatory bowel disease.
Gastroenterol. 64, 43 - 50 (1973).
- 17) Calder, E.A., Irvine, W.J., Davidson, N.McD., Wu, F.:
T, B and K cells in autoimmune thyroid disease.
Clin. Exp. Immunol. 25, 17 - 22 (1976).
- 18) Cambell, A.C., Skinner, J.M., Hersey, P., Roberts-
Thomson, P., MacLennan, J.C.M., Truelove, S.C.:
Immunsuppression in the treatment of inflammatory
bowel disease.
I. Changes in lymphoid sub-populations in the blood
and rectal mucosa following cessation of treatment with
Azathioprine.
Clin. Exp. Immunol. 16, 521 - 533 (1974).
- 19) Cerottini, J.C., Nordin, A.A., Brunner, K.T.:
In vitro cytotoxic activity of thymus cells sensi-
tised to allo-antigens in vivo.
Nature 227, 72 - 75 (1970).
- 20) Cerottini, J.C., Nordin, A.A., Brunner, K.T.:
Specific in vitro cytotoxicity of thymus derived
lymphocytes sensitised to allo-antigens.
Nature 228, 1308 - 1309 (1970).
- 21) Cerottini, J.C., Brunner, K.T.:
Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection and
tumor immunity.
Adv. Immunol. 18, 67 - 132 (1974).

- 22) Cochrane, A.M.G., Moussouros, A., Thomson, A.D.,
Eddleston, A.L.W., Williams, R.:
Antibody-dependent cell-mediated (K-cell) cyto-
toxicity against isolated hepatocytes in chronic
active hepatitis.
Lancet 1, 441 - 444 (1976).
- 23) Cochrane, A.M.G., Moussouros, A., Smith, A., Thomson,
A.D., Eddleston, A.L.W., Williams, R.:
Autoimmune reaction to a liver specific membrane
antigen during acute viral hepatitis.
Gut 17, 714 - 718 (1976).
- 24) Cochrane, A.M.G., B.Sc., M.R.C.P., Moussouros, A.,
B., M.D., Portmann, B., McFarlane, H.D.I.G., Sc., B.,
D., Ph., Thomson, A.D., Eddleston, A.L.W.F., Williams, R.:
Lymphocyte cytotoxicity for isolated hepatocytes in
alcoholic liver disease.
Gastroenterol. 72, 918 - 923 (1977).
- 25) Cordier, G., Samarnt, C., Brochir, J., Revillard, J.P.:
Antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC).
Characterization of 'Killer' cells in human lymphoid
organs.
Scand. J. Immunol. 5, 233 - 242 (1976).
- 26) Deodhar, S.D., Michener, W.M., Farmer, R.G.:
A study of the immunological aspects of chronic
ulcerative colitis and transmural colitis.
Am. J. Clin. Pathol. 51, 591 - 595 (1969).
- 27) Dykes, P.W.:
Delayed hypersensitivity in Crohn's disease.
Proc. Roy. Soc. Med. 63,
906 - 908 (1970).
- 28) Dykes, P.W.:
Unpublished observations (1971).

- 29) Eckhardt, R., Heinisch, M., Meyer zum Büschenfelde, K.H.:
Cellular immune reactions against Common Antigen, small intestine, and colon antigen in patients with Crohn's disease, ulcerative colitis, and cirrhosis of the liver. Scand. J. Gastroenterol. 11, 49 - 54 (1976).
- 30) Edington, T.S., Chisari, F.V.:
Immunological aspects of hepatitis B virus infection. Amer. J. Med. Sci. 270, 213 - 227 (1975).
- 31) Feldmann, J.L., Becker, M.J., Moutsopoulos, H., Fey, K., Blachmann, M., Epstein, W.V., Talal, N.:
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in selected autoimmune disease. J. Clin. Invest. 58, 173 - 179 (1976).
- 32) Ferguson, A.C., Lawlor, G.J., Neumann, C.G., Oh, W., Stiehm, E.R.:
Decreased rosette-forming-lymphocytes in malnutrition and intrauterine growth retardation. J. Pediatr. 85, 717 - 722 (1974).
- 33) Fletcher, J., Hinton, J.M.:
Tuberkulin sensitivity in Crohn's disease. A controlled study. Lancet 2, 753 - 754 (1967).
- 34) Forman, J., Möller, G.:
The effector cell in antibody-induced cell-mediated immunity. Transplant. Rev. 17, 108-149 (1973).
- 35) Gale, R.P., Zigelboim, J.:
Polymorphonuclear leucocytes in antibody-dependent cellular cytotoxicity. J. Immunol 114, 1047 - 1051 (1975).

- 36) Gelernt, J.M., Present, D.H., Janowitz, H.D.:
Alterations in the serum immunoglobulins after resection
for ulcerative and granulomatous disease of the intestine.
Gut 13, 21 - 23 (1972).
- 37) Golstein, P., Wigzell, H., Blomgren, H., Svedmyr, E.A.J.:
Cells mediating specific in vitro cytotoxicity.
II. Probable autonomy of thymus processed lympho-
cytes (T cells) for killing allogeneic target cells.
J. Exp. Med. 135, 890 - 898 (1972).
- 38) Green, F.H.Y., Fox, H.:
The distribution of mucosal antibodies in the bowel
of patients with Crohn's disease.
Gut 16, 125 - 131 (1975).
- 39) Greenberg, A.H., Shen, L., Roitt, I.M.:
Characterization of the antibody-dependent cytotoxic
cell. A nonphagocytic monocyte?
Clin. Exp. Immunol. 15, 251 - 259 (1973).
- 40) Härfast, B., Andersson, T., Perlmann, P.:
Human lymphocyte cytotoxicity against mumps virus-
infected target cells. Requirement for non-T cells.
J. Immunol. 114, 1820 - 1823 (1975).
- 41) Harding, P., Pudifin, D.J., Gotch, F., MacLennan, J.C.M.:
Cytotoxic lymphocytes from rats depleted of thymus
processed cells.
Nature: New Biology 232, 80 - 82 (1971).
- 42) Harrison, W.J.:
Autoantibodies against intestinal and gastric cells
in ulcerative colitis.
Lancet 1, 1346 - 1350 (1965).
- 43) Høj, L., Sørensen, S.F.:
Lymphocyte subpopulations in chronic inflammatory bowel
disease.
Scand. J. Gastroenterol. 11, Suppl. 38, 91 - 98 (1976).

- 44) Holm, G.:
Lysis of antibody-treated human erythrocytes by
human leukocytes and macrophages in tissue culture.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 43, 671 - 682 (1972).
- 45) Holm, G., Hammarström, S.:
Haemolytic activity of human blood monocytes.
Lysis of human erythrocytes, treated with anti-A serum.
Clin. Exp. Immunol. 13, 29 - 43 (1973).
- 46) Holm, G., Björkholm, M., Mellstedt, H., Johanssen, B.:
Cytotoxic activity of lymphocytes from patients with
Hodgkin's disease.
Clin. Exp. Immunol. 21, 376 - 383 (1975).
- 47) Hopf, U., Arnold, W., Meyer zum Büschenfelde, K.H.,
Förster, E., Bolte, J.P.:
I. Membrane-fixed IgG on isolated hepatocytes from
patients.
Clin. Exp. Immunol. 22, 1 - 8 (1975).
- 48) Jensen, K.B., Gollermann, N., Jarnum, S., Week, B.,
Westergaard, H.:
IgM turnover in Crohn's disease.
Gut 2, 223 - 228 (1970).
- 49) Jewell, D.P., MacLennan, I.C.M.:
Circulating immune complexes in inflammatory bowel
disease.
Clin. Exp. Immunol. 14, 219 - 226 (1973).
- 50) Jondal, M., Wigzell, H., Ainti, F.:
Human lymphocyte subpopulations: Classification
according to surface markers and/or functional
characteristics.
Transplant. Rev. 16, 163 - 195 (1973).

51) Jondal, M.:

Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against Epstein-Barr virus-determined membrane antigens. I. Reactivity in sera from normal persons and from patients with acute infectious mononucleosis.

Clin. Exp. Immunol. 25, 1 - 5 (1976).

52) Jones, J.V., Housley, J., Ashurst, P.M., Hawkins, C.F.:

Development of delayed hypersensitivity to dinitrochlorobenzene in patients with Crohn's disease.

Gut 10, 52 - 56 (1969).

53) Karlsh, A.J.:

Kweim test in Crohn's disease.

Lancet. 2, 977 - 986 (1970).

54) Kedar, E., Ortiz de Landazuri, M., Fahey, J.L.:

Comparative studies of immunoglobulin receptors and antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) in rat lymphoid organs.

J. Immunol. 112, 37 - 46 (1974).

55) Kissmeyer-Nielsen, F., Kjerbye, K.E.:

Lymphocytotoxic microtechnique: Purification of lymphocytes by flotation.

Histocompatibility testing, p. 381 Copenhagen (1967).

56) Lagercrantz, R., Hammarström, S., Perlmann, P.,

Gustafsson, B.E.:

Immunological studies in ulcerative colitis.

III. Incidence of antibodies to colon-antigen in ulcerative colitis and other gastrointestinal diseases.

Clin. Exp. Immunol. 1, 263 - 276 (1966).

- 57) Lamon, E.W., Skurzak, H.M., Andersson, E., Whitten, H.D., Klein, E.:
Antibody-dependent lymphocyte cytotoxicity in the murine sarcoma virus system: activity of IgG with specificity for MLW-determined antigen (s)
J. Immunol. 114, 1171 - 1176 (1975).
- 58) Lamon, E.W., Whitten, H.D., Skurzak, H.M., Andersson, B., Lidin, B.:
IgM-antibody dependent cell-mediated cytotoxicity in the Moloney sarcoma virus system: the involvement of T- and B-lymphocytes as effector cells.
J. Immunol. 115, 1288 - 1294 (1975).
- 59) Larsson, A., Perlmann, P.:
Study of F ab and F (ab)₂ from rabbit IgG for capacity to induce lymphocyte mediated target cell destruction in vitro.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 43, 80 - 88 (1972).
- 60) Larsson, A., Öhlander, C., Perlmann, P.:
In vitro target cell lysis mediated by normal human lymphocytes. Influence of molecular proportion and affinity of inducing antibody.
Scand. J. Immunol. 4, 649 - 652 (1975).
- 61) Lobo, P.I., Westervelt, F.B., Horwitz, D.A.:
Identification of two populations of immunoglobulin-bearing lymphocytes in man.
J. Immunol. 114, 116 - 119 (1975).
- 62) Loewi, G., Temple, A.:
Cytotoxicity of immune guinea-pig cells.
I. Investigation of a correlation with delayed hypersensitivity and a comparison of cytotoxicity of spleen, lymphnode and peritoneal exudate cells.
J. Immunol. 23, 559 - 567 (1972).

- 63) MacLennan, I.C.M., Harding, B.:
Failure of certain lymphocytes to respond
mitotically to phytohaemagglutinin.
Nature 227, 1246 - 1248 (1970).
- 64) MacLennan, I.C.M.:
Antibody in the induction and inhibition of
lymphocyte cytotoxicity.
Transplant. Rev. 13, 67 - 90 (1972).
- 65) Martini, G.A., Brandes, J.W.:
Increased consumption of refined carbohydrates in
patients with Crohn's disease.
Klin. Wochenschr. 54, 367 - 375 (1976).
- 66) McFarlane, H., Hamid, J.:
Cell mediated immune response in malnutrition.
Clin. Exp. Immunol. 13, 153 - 158 (1973).
- 67) Meyer zum Büschenfelde, K.H., Arnold, W., Knolle, J.,
Hess, G.:
Immunreaktionen gegenüber HB_SAg, HB_CAg und 'e'-Antigen bei
akuter Virushepatitis sowie lebergesunden und leber-
kranken HB_SAg-Trägern.
Z. Gastroenterol. 14, 365 - 377 (1976).
- 68) Miller, D.S., Keighley, A.C., Langman, M.J.S.:
Epidemiology of Crohn's disease.
Lancet 2, 1263 - 1267 (1974).
- 69) Miller, J.L., Humphreys, R.E., Mann, D.L.:
Lack of association of human 'B cell' antigens and
Fc receptor activity of antibody-dependent cytotoxic
lymphocytes.
J. Immunol. 117, 491 - 496 (1976).

- 70) Mitchell, D.N., Rees, R.J.W.:
Agent transmissible from sarcoid tissue.
Lancet 2, 81 - 84 (1969).
- 71) Mitchell, D.N., Rees, R.J.W.:
Agent transmissible from Crohn's disease tissue.
Lancet 2, 168 - 171 (1970).
- 72) Mitchell, D.N., Cannon, P., Dyer, NH:
Further observations on Kweim test in Crohn's disease.
Lancet 2, 496 - 498 (1970).
- 73) Möller, G., Svehag, S.E.:
Specificity of lymphocyte-mediated cytotoxicity induced
by in vitro antibody-coated target cells.
Cell. Immunol. 4, 1 - 19 (1972).
- 74) Oberhelman, H.A.:
Diverting ileostomy in the surgical management of
Crohn's disease of the colon.
Amer. J. Surg. 115, 231 - 239 (1968).
- 75) Papamichail, M., Temple, A.:
Characterization of human effector cell causing anti-
body-mediated cytotoxicity.
Clin. Exp. Immunol. 20, 459 - 467 (1975).
- 76) Perlmann, P., Broberger, O.:
In vitro studies of ulcerative colitis. II. Cytotoxicity
of white blood cells from patients on human foetal
colon cells.
J. Exp. Med. 117, 717 - 733 (1963).
- 77) Perlmann, P., Hammarström, S.:
Antigen from colon of germfree rats and antibodies in
ulcerative colitis.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 124, 377 - 393 (1965).

- 78) Perlmann, P., Hammarström, S., Lagercrantz, R.,
Campbell, D.:
Autoantibodies to colon in rats in human ulcerative
colitis: cross reactivity with *Escherichia coli* o:14
antigen.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 975 - 980 (1967).
- 79) Perlmann, P., Perlmann, H.:
Contactual lysis of antibody-coated chicken
erythrocytes by purified lymphocytes.
Cell. Immunol. 1, 300 - 315 (1970).
- 80) Perlmann, P., Perlmann, H., Wigzell, H.:
Lymphocyte mediated cytotoxicity in vitro. Induction
and inhibition by humoral antibody and nature of
effector cells.
Transplant. Rev. 13, 91 - 114 (1972).
- 81) Perlmann, P., Perlmann, H., Müller-Eberhard, H.J.:
Cytolytic lymphocytic cells with complement receptors
in human blood, induction of cytolysis by IgG anti-
body but not by target cell-bound C'3.
J. Exp. Med. 141, 287 - 296 (1975).
- 82) Phear, D.N.:
The relation between regional ileitis and sarcoidosis.
Lancet 2, 1250 - 1251 (1958).
- 83) Preud'Homme, J.L., Flandrin, G.:
Identification by peroxidase staining of monocytes
in surface immunofluorescence tests.
J. Immunol. 113, 1650 - 1653 (1974).
- 84) Pross, H.F., Jondal, M.:
Cytotoxic lymphocytes from normal donors. A functional
marker of human non-T lymphocytes.
Clin. Exp. Immunol. 21, 226 - 235 (1975).

- 85) Ramshaw, I.A., Parish, C.R.:
Surface properties of cells involved in antibody-
dependent cytotoxicity.
Cell. Immunol. 21, 226 - 235 (1976).
- 86) Richens, E.R., Williams, M.J., Gough, K.R., Ancill, R.J.:
Leucocyte migration studies in Crohn's disease using
Crohn's colon homogenate and mitochondrial and microsomal
fractions.
Gut 15, 19 - 23 (1974).
- 87) Röllinghof, M., Schrader, J., Wagner, H.:
Effect of Az and cytosine-arabinosid on humoral and
cellular immunity in vitro.
Clin. Exp. Immunol. 15, 261 - 269 (1973).
- 88) Röpke, C.:
Lymphocyte transformation and delayed hypersensitivity
in Crohn's disease.
Scand. J. Gastroenterol. 7, 671 - 677 (1972).
- 89) Schneider, J., Chin, W., Friou, G.J., Cooper, S.M.,
Harding, B., Hill, R.L., Quismorio, F.P.:
Reduced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
in systemic lupus erythematosus.
Clin. Exp. Immunol. 20, 187 - 192 (1975).
- 90) Shorter, R.G., Spencer, R.J., Huizinga, K.A.,
Hallenbeck, G.A.:
Inhibition of in vitro cytotoxicity of lymphocytes
from patients with ulcerative colitis and granulo-
matous colitis for allogenic colonic epithelial cells
using horse anti-human thymus-serum.
Gastroenterol. 54, 227 - 231 (1968).
- 91) Shorter, R.G., Cardoza, M., Spencer, R.J., Huizinga, K.A.:
Further studies of in vitro cytotoxicity of lympho-
cytes from patients with ulcerative and granuloma-
tous colitis for allogenic epithelial cells including

zu 91)

the effects of colectomy.

Gastroenterol. 56, 304 - 309 (1969).

- 92) Shorter, R.G., Cardoza, M., Huigenza, K.A., Remine, S.G.,
Spencer, R.J.:

Further studies of in vitro cytotoxicity of lymphocytes for colonic epithelial cells.

Gastroenterol. 57, 30 - 35 (1969).

- 93) Shorter, R.G., Huizenga, K.A., Remine, S.G.:

Effects of preliminary incubation of lymphocytes with serum on their cytotoxicity for colonic epithelial cells.

Gastroenterol. 58, 843 - 850 (1970).

- 94) Shorter, R.G., Huizenga, K.A., Spencer, R.J., Mas, J.,
Guy, S.K.:

Cytotoxic antibody: The responsible factor in the cytotoxicity of lymphocytes in inflammatory bowel disease.

Gastroenterol. 60, 802 - 807 (1971).

- 95) Shorter, R.G., Huizenga, K.A., Spencer, R.J., Guy, S.K.:

The role of lymphotoxin in the cytotoxicity of lymphocytes for colonic epithelial cells.

Amer. J. Dig. Dis. 17, 689 - 696 (1972).

- 96) Shorter, R.G., Huizenga, K.A., Spencer, R.J., Weedon, D.:

Lymphotoxin in nonspecific inflammatory bowel disease lymphocytes.

Amer. J. Dig. Dis. 18, 79 - 83 (1973).

- 97) Siltzbach, L.E.:

Is there Kweim responsiveness in Crohn's disease?

Lancet 2, 634 - 636 (1971).

- 98) Strickland, R.G., Korsmeyer, S., Soltis, R.D.,
Wilson, I.D., Williams, R.C.:
Peripheral blood T and B cells in chronic inflammatory
bowel disease.
Gastroenterol. 67, 569 - 577 (1974).
- 99) Taylor, K.B., Truelove, S.C.:
Circulating antibodies to milk protein in
ulcerative colitis.
Brit. Med. J. 2, 924 - 929 (1961).
- 100) Taylor, K.B., Truelove, S.C., Wright, R.:
Serologic reactions to gluten and cow's milk
proteins in gastrointestinal disease.
Gastroenterol. 46, 99 - 108 (1964).
- 101) Thayer, W.R., Brown, M., Sangree, M.H., Katz, J., Herish, T.
Escherichia coli o:14 and colon haemagglutinating
antibodies in inflammatory bowel disease.
Gastroenterol. 57, 311 - 318 (1969).
- 102) Thayer, W.R., Charland, C., Field, C.E.:
Complement bearing and other lymphocytes in inflammatory
bowel disease.
Gastroenterol. 68, 997 - 1002 (1975).
- 103) Thomson, A.D., Cochraine, M.A.G., MacFarlane, J.G.,
Eddlestone, A.L.W.F., Williams, R.:
Lymphocyte cytotoxicity to isolated hepatocytes
in chronic active hepatitis.
Nature 252, 721 - 722 (1974).
- 104) Tilz, G.P.:
Folgereaktionen.
In: Praxis der Immunologie. Grundlagen, Methoden,
Klinik. Vorlaender, K.O. (Hsg.), Thieme, Stuttgart 1976
- 105) Trinchieri, G., Baumann, P., de Marchi, M., Tökes, Z.:
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in
humans. I. Characterization of the effector cell.
J. Immunol. 115, 249 - 255 (1975).

- 106) Truelove, S.C., Ellis, H., Webster, C.U.:
Place of a double-barreled ileostomy in ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon: a preliminary report.
Brit. Med. J. 1, 150 - 153 (1965).
- 107) Van Boxel, J.A., Stobo, J.D., Paul, W.E., Green, J.:
Antibody-dependent lymphoid cell-mediated cytotoxicity: no requirement for thymus-derived lymphocytes.
Science 175, 194 - 195 (1971).
- 108) Van Boxel, J.A., Paul, W.E., Frank, M.M., Green, J.:
Antibody-dependent lymphoid cell mediated cytotoxicity. Role of lymphocytes bearing a receptor for complement.
J. Immunol. 110, 1027 - 1041 (1973).
- 109) Verrier-Jones, J., Hously, J., Ashurst, P.M., Hawkins, C.F.:
Development of delayed hypersensitivity to dinitrochlorobenzene in patients with Crohn's disease.
Gut 10, 52 - 56 (1969).
- 110) Wahlin, B., Perlmann, H., Perlmann, P.:
Analysis by a plaque assay of IgG- or IgM-dependent cytolytic lymphocytes in human blood.
J. Exp. Med. 144, 1375 - 1380 (1976).
- 111) Walker, J.G., Greaves, M.F.:
Delayed hypersensitivity and lymphocyte transformation in Crohn's disease and proctocolitis.
Gut 10, 414 - 418 (1969).
- 112) Walker, W.S., Demus, A.:
Antibody-dependent cytolysis of chicken erythrocytes by an in vitro-established line of mouse peritoneal macrophages.
J. Immunol. 114, 765 - 769 (1975).

- 113) Watson, D.W., Quigley, A., Bolt, R.J.:
The cytotoxicity of circulating lymphocytes from ulcerative colitis patients for human colon epithelial cells: disease specificity and relationship to disease activity.
Gastroenterol. 50, 886 - 887 (1966).
- 114) Watson, D.W., Quigley, A., Bolt, R.J.:
Effect of lymphocytes from patients with ulcerative colitis on human adult colon epithelial cells.
Gastroenterol. 51, 985 - 993 (1966).
- 115) Watson, D.W., Martucci, R.:
Inhibition of peripheral leucocyte migration by E. coli O 119:B 14 antigen in normal individuals and patients with chronic inflammatory bowel disease.
Gastroenterol. 64, 818 - 826 (1973).
- 116) Whorwell, P.J., Wright, R.:
Immunological aspects of inflammatory bowel disease.
Clin. Gastroenterol. 5, 303 - 321 (1976).
- 117) Williams, W.J.:
A study of Crohn's syndrome using tissue extracts and the Kweim and Mantoux tests.
Gut 6, 503 - 505 (1965).
- 118) Willoughby, J.M.T., Mitchell, D.N.:
In vitro inhibition of leucocyte migration in Crohn's disease by sarcoid spleen suspension.
Brit. Med. J. 3, 155 - 157 (1971).
- 119) Wisløff, F., Frøland, S.S.:
Antibody-dependent lymphocyte-mediated cytotoxicity in man: no requirement for lymphocytes with membrane-bound immunoglobulin.
Scand. J. Immunol. 2, 151 - 157 (1973).
- 120) Wisløff, F., Frøland, S.S.:
Antibody-dependent cytotoxicity mediated by human FC-receptor-bearing cells lacking markers for B-cells.

zu 120)

T lymphocytes.

Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 47, 139 - 154 (1974).

- 121) Wisløff, F., Frøland, S.S., Natvig, J.B.:
Deficient lymphoid cell-mediated, PHA-induced
cytotoxicity in rheumatoid arthritis patients.
Scand. J. Immunol. 4, 303 - 307 (1975).
- 122) Wright, R., Truelove, S.C.:
Autoimmune reactions in ulcerative colitis.
Gut 7, 32 - 40 (1966).
- 123) Zeromski, J., Perlmann, P., Lagercrantz, R.,
Hammarström, S., Gustafsson, B.E.:
Immunological studies in ulcerative colitis. VI. Light
microscopic studies with peroxidase conjugated
antibodies.
Clin. Exp. Immunol. 7, 463 - 467 (1970).
- 124) Zeromski, J., Perlmann, P., Lagercrantz, R.,
Hammarström, S., Gustafsson, B.E.:
Immunological studies in ulcerative colitis. VII. Anti-
colon antibodies of different immunoglobulin classes.
Clin. Exp. Immunol. 11, 469 - 475 (1970).
- 125) Zigelboim, J., Gale, R.P., Chin, A., Bonavida, B.:
Antibody-dependent cellular cytotoxicity. Cytotoxicity
mediated by non T-lymphocytes.
Clin. Immunol. Immunopathol. 3, 193 - 200 (1974).

VIII. ANERKENNUNG

Für die freundliche Überlassung des Themas und hilfreiche Anregungen danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. med. Meyer zum Büschenfelde sowie Herrn Prof. Dr. R. Eckhardt für Textkritik und manche Hilfestellung.

Herrn Prof. Dr. med. H.J. Gilfrich gilt mein Dank für die Übernahme des Referats.

Frau Helga Grönniger danke ich für die unermüdliche Assistenz.

Herr Walter Engel hat mich während meines Studiums freundlicherweise mit Fachliteratur unterstützt.

IX. LEBENS LAUF

Am 7.8.1950 wurde ich, Peter Jürgen Kloos, als Sohn des Franz Josef Kloos und seiner Gattin, Gerta Kloos, geb. Bartoschitz, in Birstein, Main-Kinzig-Kreis, geboren.

Meine Eltern übersiedelten 1953 nach Wiesbaden - Bierstadt, wo ich vom 3.5.1957 bis 31.3.1962 die Robert-Koch-Volksschule besuchte. Vom 25.4.1962 bis 13.7.1967 war ich Schüler der Albrecht-Dürer-Realschule bis zur Erlangung der Mittleren Reife. Mit der Hochschulreife beschloß ich die Ausbildung am Oranien-Gymnasium in Wiesbaden vom 3.9.1967 bis 19.6.1970.

Ich studierte ab 19.10.1970 ein Semester kath. Theologie (Pastoralmedizin) und Philosophie an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz und begann anschließend das Studium der Humanmedizin im Sommersemester 1971 an der gleichen Ausbildungsstätte. Ich beschloß das Studium am 14.11.1977 mit dem Med. Staatsexamen.

Vom 1.2.1978 bis 31.1.1979 war ich Medizinalassistent an den Städtischen Kliniken in Wiesbaden. Vom 5.2.1979 bis 30.4.1980 leistete ich meinen Grundwehrdienst als Truppenarzt VBK 51, 7140 Ludwigsburg. Seit 1.5.1980 arbeite ich als Assistenzarzt im Krankenhaus zum Roten Kreuz, 7000 Stuttgart-Bad Cannstatt.

Ich habe 1975 die Heilpädagogin Christiane Brunne geheiratet. Wir haben einen fünfjährigen Sohn, eine zweijährige und eine fünf Monate alte Tochter.

Meine Doktorarbeit entwickelte ich unter Leitung von Herrn Professor Meyer zum Büschenfelde, II. Med. Klinik der Universitätskliniken Mainz, jetzt Universitätsklinikum Charlottenburg, Berlin.

